

На правах рукописи

СПЕРАНСКАЯ ЕЛЕНА ВАЛЕНТИНОВНА

**ЧАСТОТА ОБНАРУЖЕНИЯ ТРУДНОКУЛЬТИВИРУЕМЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ - ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ
РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ И
ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА ИХ ДЕТЕКЦИИ**

03.02.03-микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Нижний Новгород - 2015

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор
Ефимов Евгений Игоревич
доктор биологических наук, доцент
Мазепа Владимир Николаевич

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии ГБОУ ВПО "Казанский медицинский университет"
Мусина Линара Табрисовна

доктор биологических наук, доцент
Никифоров Алексей Константинович
(ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, заместитель директора по экспериментально-производственной работе)

Ведущая организация: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «29» октября 2015 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Карла Маркса, д.74, Институт фундаментальной медицины и биологии, ауд. 205, тел./факс (843)238-71-21, 233-78-40.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. И.Н. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» www.kpfu.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Инфекционные воспалительные болезни органов дыхания (БОД), включая внебольничные пневмонии (ВП), остаются актуальной проблемой современного здравоохранения. Они являются причиной большинства госпитализаций, на них приходится большое количество смертельных исходов. Так, согласно официальной статистике в Российской Федерации общее число больных пневмонией ежегодно превышает 1,5 миллиона, каждый год от пневмонии погибает более 40 тысяч человек, при этом наиболее высокая смертность регистрируется у мужчин трудоспособного возраста (Чучалин А.Г., 2006, 2010; Синопальников А.И., 2010, 2012; Онищенко Г.Г., Ежлова К.Б., Демина Ю.В. с соавт., 2013). Отдельную проблему представляют БОД в закрытых воинских коллективах, где уровни заболеваемости превышают показатели среди гражданского населения в несколько раз (Жоголев С.Д., Огарков П.И., 2003).

Наряду с традиционными этиологическими агентами БОД (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, вирусами гриппа и др.) всё большее значение приобретают «атипичные», труднокультивируемые патогены, такие как *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* и др., а также вирусы группы герпеса (*Cytomegalovirus (CMV)*, *Herpes simplex I/II*), роль которых в развитии респираторных инфекций и необходимость их индикации и идентификации отражена в новых нормативных документах: МУ 3.1.2.3047-13 «Эпидемиологический надзор за внебольничными пневмониями»; МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний», СП 3.1.2.3116-13 "Профилактика внебольничных пневмоний". На фоне снижения иммунного статуса населения возрастает этиологическая роль этих возбудителей в формировании патологии органов дыхания (Вишнякова Л.А., 2005; Карапетян Т.А., 2008). По данным литературы на их долю приходится до 30 % случаев заболеваний респираторного тракта, при этом частота их выявления при различных нозологических формах у разных авторов существенно варьирует (Чучалин А.Г., 2006; Онищенко Г.Г. с соавт., 2013, 2014; Демина Ю.В., 2014; Cunha B.A., 2010; Kurz H., 2011; Lui G., 2009).

Следует отметить, что указанные выше «атипичные» возбудители традиционными методами (бактериологическими, иммунологическими, серологическими) детектируются недостаточно надежно из-за особых требований к условиям культивирования, высокой антигенной изменчивости и т.д., поэтому, несмотря на значительные затраты времени и средств, в 30-70% случаев этиологический фактор установить не удастся (Чучалин А.Г., 2008; Сао В., 2010). В этом плане полимеразная цепная реакция (ПЦР), основанная на амплификации специфических фрагментов генома микроорганизмов, является ценным диагностическим инструментом, позволяющим выявлять инфекционные агенты в любом биологическом субстрате и совершенствующим диагностику как острых, так и хронических БОД. Использование метода ПЦР в клинической практике одобрено и рекомендовано рядом нормативных документов (МУК 42.3115-13

«Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний», СП 3.1.2.3116-13 "Профилактика внебольничных пневмоний"). Важно, что данный метод характеризуется высокой чувствительностью (100-1000 клеток или вирионов), экспрессностью (получение результата в течение 6-8- часов), прецизионной специфичностью (до 100%) (Шипулин Г.А., 2014; Dumke R., 2007).

Степень разработанности темы исследования. Значительный вклад в изучение роли труднокультивируемых микроорганизмов (*S. pneumoniae*, *S. psittaci*, *M. pneumoniae*, *L. pneumophila*, CMV и др.) в развитии БОД внесли как отечественные - Синопальников А.И., 2006; Тартаковский И.С., 2010; Чучалин А.Г., 2010; Шахгильдян В.И., 2010 и др. так и зарубежные – Cunha V.A., 2010; Kurz H., 2011; Lui G., 2009 и др. исследователи. В последние годы в диагностике заболеваний респираторного тракта широко используются молекулярно-биологические методы, главным образом, различные варианты ПЦР (Яцишина С.Б., 2008; Gullsby K., 2008; Khanna M., 2005; Loens K., 2008 и др.). Разработаны, сертифицированы и производятся ПЦР-диагностикумы для выявления возбудителей инфекционных БОД.

Однако обследования обширных контингентов больных в зависимости от возраста и форм патологий органов дыхания на широкий спектр труднокультивируемых возбудителей с использованием метода ПЦР в Российской Федерации не проводились. До сих пор не определен наиболее информативный субстрат для исследования. Обычно исследуют различные биологические субстраты: образцы мокроты, мазков из зева, носоглотки, бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), плевральной жидкости, биопсийного материала (Cho M., 2012; Murdoch D.R., 2003), что затрудняет интерпретацию результатов и постановку точного диагноза.

Рост заболеваемости БОД, широкий спектр традиционных и «атипичных» возбудителей, генетическая изменчивость патогенов требуют широкого внедрения в лабораторную практику унифицированных молекулярно-генетических методов исследования для решения диагностических, клинических и эпидемиологических задач.

Цель и задачи исследований. Цель данной работы состояла в оптимизации способа детекции труднокультивируемых возбудителей БОД (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*), а также вирусов группы герпеса и оценке частоты их обнаружения в зависимости от возраста больных и нозологической формы заболевания.

В соответствии с поставленной целью работы решались следующие задачи:

1. Определить наиболее информативный биологический субстрат для ПЦР-диагностики труднокультивируемых возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания.
2. Создать эффективный и экономически оправданный способ ПЦР-детекции редко встречающихся труднокультивируемых возбудителей БОД.
3. Оценить частоту выявления *M. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *S. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex I/II* у детей разных

возрастных групп и взрослых (организованных и неорганизованных) с различными воспалительными заболеваниями респираторного тракта.

4. Разработать оптимальный алгоритм молекулярной детекции *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex I/II* у больных разных возрастных групп с воспалительными бронхолегочными заболеваниями.

Научная новизна. Впервые разработан способ ПЦР-детекции редко встречающихся труднокультивируемых микроорганизмов в различных биологических субстратах от детей и взрослых с бронхолегочной патологией (патент на изобретение №2406088 от 10.12.2010г. «Способ выявления редких и труднокультивируемых форм возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания (*Cytomegalovirus*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*) с использованием метода ПЦР»).

Впервые проведено крупномасштабное обследование больных разных возрастных групп с различными бронхолегочными инфекциями на широкий спектр труднокультивируемых возбудителей бактериальной и вирусной природы с применением метода ПЦР.

Получены новые знания о частоте обнаружения отдельных видов труднокультивируемых микроорганизмов у детей разных возрастных групп и взрослых с различными нозологическими формами инфекционных заболеваний органов дыхания.

Впервые разработана новая медицинская технология «Комплексное ПЦР-обследование пациентов с инфекционно-аллергическими заболеваниями органов дыхания» (разрешение на применение ФС № 2009/084 от 21.04.09 г. Минсоцздрава РФ), позволяющая сокращать себестоимость исследования и повышать эффективность выявления инфекционных агентов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены новые знания о частоте обнаружения труднокультивируемых микроорганизмов при бронхолегочных заболеваниях, которые могут явиться дополнительным вкладом в изучение этиопатогенеза и развития инфекционного процесса БОД.

Показано, что частота выявления труднокультивируемых микроорганизмов - возбудителей БОД - зависит от вида возбудителя, контингента и возраста обследуемых лиц, нозологической формы заболевания.

Разработанный способ ПЦР-детекции труднокультивируемых возбудителей БОД позволяет повысить эффективность и достоверность диагностических исследований, уменьшить их продолжительность и снизить стоимость в 3,8 - 7,6 раза.

Установлено, что идентификация «атипичных» микроорганизмов в режиме сопровождения лечебного процесса способствует оперативной коррекции антибактериальной и иммуномодулирующей терапии, позволяет сократить сроки пребывания больного в стационаре.

Разработанный способ выявления труднокультивируемых возбудителей заболеваний органов дыхания, защищенный патентом №2406088, внедрен в

диагностическую работу ряда лечебных учреждений г. Нижнего Новгорода и Нижегородской области.

Результаты выполненного исследования использованы при разработке медицинской технологии «Комплексное ПЦР-обследование пациентов с инфекционно-аллергическими заболеваниями органов дыхания» (Разрешение на применение медицинской технологии ФС № 2009/084 от 21.04.09 Минсоцздрава РФ), методических рекомендаций «Выявление редких труднокультивируемых форм возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания с использованием метода ПЦР» (МР 4.2.0060-12, 2012 г.), методических рекомендаций «Алгоритм выявления широкого спектра возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания» (рекомендованы для использования на региональном уровне письмом Роспотребнадзора №01/8010-12-26 от 18.07.2012).

Положения, выносимые на защиту:

1. Способ ПЦР-детекции редко встречающихся труднокультивируемых микроорганизмов, основанный на применении метода «двойных минипулов», позволяет осуществлять диагностически и экономически оправданный скрининг больных с разными типами патологии респираторного тракта, сокращает стоимость и продолжительность диагностических исследований.
2. Нозологическая форма болезней органов дыхания, контингент и возраст обследуемых лиц, видовые особенности возбудителя определяют частоту выявления труднокультивируемых инфекционных агентов – возбудителей заболеваний респираторного тракта.
3. Доминирующими возбудителями в этиологической структуре болезней органов дыхания из числа труднокультивируемых микроорганизмов являются у детей - *M.pneumoniae*, у взрослых - *M.pneumoniae* и *S.pneumoniae*.

Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается достаточным объемом выборки анализируемых групп, большим количеством проведенных исследований (исследованы пробы различных клинических субстратов от 1841 пациента с бронхолегочной патологией и 449 лиц групп сравнения, проведено 31843 ПЦР-исследования), использованием сертифицированных молекулярно-генетических, иммунологических методов, которые характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью.

Апробация работы. Диссертация апробирована на совместном заседании Ученого совета и Межлабораторного научного семинара ФБУН «ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора (Протокол № 8 от 30.10.14 г.). Результаты работы доложены и обсуждены на VII Российском съезде инфекционистов «Новые технологии в диагностике и лечении инфекционных болезней», г.Н.Новгород, 2006г.; Втором Всероссийском форуме «Здоровье нации – основа процветания России», г. Москва, 2006г.; научной конференции, посвященной 85-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной, г.Н.Новгород, 2006г.; IV Всероссийской научно-практической конференции «Молекулярная диагностика», г. Москва, 2007г.; Юбилейной Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 90-летию Нижегородского

НИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной, г. Н.Новгород, 2009г.; научно-практической конференции молодых ученых «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения», г. Н.Новгород, 2011г.; V Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням, г. Москва, 2013 г.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Исследования осуществлялись в рамках отраслевых программ: «Научные аспекты обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в РФ на 2006-2010 гг.» (раздел НИР «Изучение распространения и особенностей циркуляции атипичных и труднокультивируемых возбудителей воспалительных и инфекционно-аллергических заболеваний дыхательной системы» (№ гос. регистрации 01200612239)) и «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» на 2011-2015гг. (техническое задание от 11.01.2011г. «Изучение персистенции вирусов группы герпеса (I, II, III, IV, V, VI, VII типов) и бактерий рода *Mycoplasma* у детей с использованием молекулярно-генетических методов. Разработка алгоритма мониторинга активной репликации герпесвирусов у детей различных возрастных групп» (№ гос. регистрации 01201175712)). Один из разделов работы выполнялся в рамках задания Министерства обороны РФ «Исследование особенностей эпидемиологии и течения внебольничных пневмоний у военнослужащих на современном этапе» (2003-2007гг.).

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в выполнении молекулярно-генетических исследований, теоретическом обобщении результатов, статистической обработке данных. Соискатель в соавторстве разработал медицинскую технологию (разрешение на применение медицинской технологии ФС № 2009/084), методические рекомендации МР 4.2.0060-12, методические рекомендации «Алгоритм выявления широкого спектра возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания» (письмо Роспотребнадзора №01/8010-12-26 от 18.07.2012). Полученные соискателем результаты послужили основой для разработки и получения патента на изобретение №2406088.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, среди них 5 – в рецензируемых изданиях; 8 – в материалах конференций, съездов, форумов; 1 – патент на изобретение; 1 - медицинская технология; 1 - методические рекомендации.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 132 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективных направлений дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 13 рисунками и 8 таблицами. Список литературы содержит 200 источников, из них 20 отечественных и 180 зарубежных.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю - д.м.н., профессору Е.И. Ефимову за внимательное отношение к

работе, плодотворное обсуждение полученных результатов и всестороннюю помощь, а также д.б.н., доценту В.Н. Мазепе, под научным руководством которого были начаты и проводились исследования, послужившие основой данной работы. Особо автор благодарит заведующую лабораторией метагеномики и молекулярной индикации патогенов к.м.н., доцента Н.Ф. Бруснигину за неоценимую помощь в написании диссертации и поддержку, а также всех сотрудников лаборатории за помощь в проведении экспериментов. Автор признателен заместителю директора по научной работе ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной д.б.н., профессору Г.И. Григорьевой за ценные идеи; к.м.н., доценту кафедры госпитальной терапии им. В.Г. Вогралика ГБОУ ВПО НижГМА И.С. Добротиной за научные консультации; д.м.н., профессору В.Ю. Талаеву за проведение совместных исследований, а также сотрудникам лабораторий клеточной иммунологии и иммунохимии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной. Благодарность выражается всем сотрудникам ЛПУ, принимавшим участие в проведении данных исследований и внедрении их результатов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Исследование проводилось в период с 2005 по 2013гг. и охватывало группы детей разных возрастов и взрослых как организованных, так и неорганизованных. Было обследовано 1227 детей г. Нижнего Новгорода и Нижегородской области в возрасте от 15 дней до 16 лет с рентгенологически и клинически подтвержденными диагнозами: ВП, острый бронхит (ОБ), бронхиальная астма (БА), ОРЗ/ОРВИ. Группа организованных взрослых состояла из 469 пациентов Филиала №5 «1586 ВКГ» МО РФ - военнослужащих с рентгенологически и клинически подтвержденными диагнозами: ВП и ОБ и 145 человек (неорганизованных), представляющих неоднородную группу больных в возрасте от 25 до 60 лет, находящихся на амбулаторном или стационарном лечении в больницах г. Н. Новгорода с диагнозами ОБ, ВП. В контрольную группу входили 127 практически здоровых детей разных возрастных групп, а также 322 практически здоровых взрослых – 270 новобранцев (организованных) и 52 человека, проходивших диспансеризацию (неорганизованных). Все лица из контрольных групп не имели клинических признаков воспалительных заболеваний респираторного тракта на момент обследования и в течение предыдущего месяца.

Материалом для исследования у больных служили мокрота, мазки из ротоглотки, кровь, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), у детей первого года жизни – слюна, у здоровых - мазки из ротоглотки. Отбор материала осуществлялся в соответствии с МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории» в процедурных кабинетах стационаров и поликлиник.

Молекулярно-генетические методы

Выделение ДНК из биологических субстратов проводили с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб Б», пробы мокроты подвергались предобработке с помощью реагента «Муколизин» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Для выделения ДНК из смеси субстратов биологические субстраты от одного пациента смешивались в 1,5 мл одноразовой пробирке в равных количествах таким образом, чтобы объем смеси составил 100 мкл.

ПЦР-детекцию *M. pneumoniae*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex I/II* осуществляли с помощью тест-систем «АмплиСенс» производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора согласно инструкциям по их применению. Амплификацию проводили на приборах «Терцик МС-2» (ДНК-технология, г. Москва) или «My Cycler» (Bio-Rad, США).

ПЦР детекцию *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis* осуществляли с помощью наборов реагентов GenPak DNA PCR test производства ООО «Изоген» (г. Москва) согласно инструкциям по их применению. Амплификацию проводили на приборе «Терцик МС-2».

Чувствительность тест систем «Ампли Сенс» и «GenePak DNA PCR test» - не менее $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ бактериальных клеток или ДНК-содержащих вирусных частиц на миллилитр клинического образца.

Детекцию продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 1,8% агарозном геле с последующей регистрацией результатов с помощью ультрафиолетового трансиллюминатора («Биоком», Россия) на системе обработки изображений «Биотест-1» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва).

Иммунологические исследования

Иммунологические исследования проводились совместно с лабораториями иммунохимии и клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной, возглавляемыми к.б.н. В.В. Немовым и д.м.н., проф. Талаевым В.Ю. Было обследовано 119 военнослужащих с клинически и рентгенологически подтвержденным диагнозом ВП, у которых были обнаружены различные представители труднокультивируемых возбудителей БОД и вирусов группы герпеса. Контрольные группы состояли из взрослых практически здоровых доноров (50 человек) и здоровых лиц мужского пола призывного возраста (50 человек). У больных военнослужащих проводился трехкратный забор крови.

Изучали показатели гуморального иммунитета (содержание общих иммуноглобулинов, лактоферрина, секреторного иммуноглобулина А, уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК)) с помощью иммуноферментного и преципитационного анализов. Использовали тест-системы ЗАО «Вектор Бест».

Для изучения состояния клеточного иммунитета измеряли концентрацию цитокинов в сыворотке крови больных с помощью ИФА, определяли функциональное состояния Т-клеток и количество продуцирующих интерферон Т-клеток после поликлональной активации лимфоцитов методом оценки внутриклеточных цитокинов с помощью проточной лазерной цитометрии.

Статистические методы

Обработку данных выполняли с использованием программ Microsoft office (Excel), пакета статистических программ Statz, Statistica 6,0. Достоверность различий определяли общепринятым методом расчета ошибки среднего (m) и показателя существенности и вероятности (t).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью определения наиболее информативного биологического субстрата (или их сочетания) для исследования на *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis*, CMV, HSV I/II были проанализированы результаты детекции этих инфекционных агентов в пробах от 176 организованных взрослых пациентов с ВП. Исследовали как монообразцы биологических субстратов, так и их смеси в различных сочетаниях. У 19 военнослужащих с ВП отдельно исследовались образцы БАЛ.

Было установлено, что наиболее часто инфекционные агенты выявлялись в мокроте - в $52,8 \pm 3,8\%$ случаев (Рисунок 1). В мазках из ротоглотки возбудители обнаруживались достоверно реже - в $41,9 \pm 3,7\%$ случаев ($p < 0,05$). В образцах крови выявлялись в единичных случаях вирусы группы герпеса, бактериальные инфекционные агенты в крови обнаружены не были.

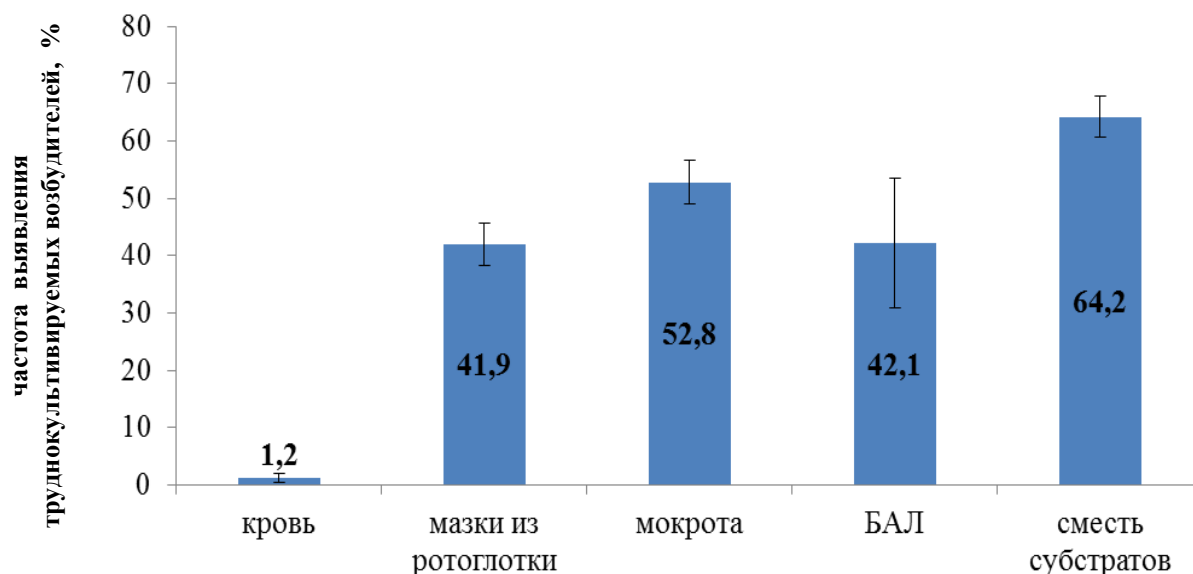


Рисунок 1. Контаминированность различных биологических субстратов труднокультивируемыми возбудителями БОД.

Установлено, что в смеси мокроты и мазков из ротоглотки процент выявления патогенов был достоверно выше и составлял $64,2 \pm 3,6\%$ ($p < 0,05$). В образцах БАЛ ($n=19$) труднокультивируемые возбудители выявлялись в 42,1% случаев.

Таким образом, показано, что исследование смеси нескольких клинических субстратов (мокроты, мазки из ротоглотки, БАЛ) на спектр искомых инфекционных агентов уменьшает вероятность ложноотрицательных результатов на 18-35% по сравнению с анализом только одного субстрата.

С учетом данных литературы и результатов собственных исследований был определен спектр возбудителей БОД, частота выявления которых, как правило, не превышала 5%: для взрослых - *C. psittaci*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis*, *CMV*; для детей - *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis*. ПЦР анализ каждого из биологических субстратов, отобранных от одного пациента, на 4-5 инфекционных агентов по традиционной схеме представляется чрезвычайно затратным вариантом исследования. Для решения этой проблемы нами была разработана новая медицинская технология ФС № 2009/084, основанная на патенте №2406088. Суть способа заключается в обнаружении редко встречающихся (менее 5%) возбудителей в пуле ДНК, выделенной из смеси субстратов (мокроты, мазков со слизистой ротоглотки, бронхоальвеолярной жидкости) от пяти пациентов.

С целью проверки чувствительности метода «двойных минипулов» были проведены сравнительные исследования 50-ти образцов ДНК, выделенной из смесей субстратов с известным содержанием инфекционных агентов. Использовали ПЦР-исследование образцов в виде «двойных минипулов» и индивидуальное ПЦР-исследование всех монообразцов. Для получения максимального разведения ДНК инфекционного агента, пулы были составлены из одного положительного и четырех отрицательных образцов. Результаты, полученные методом «двойных минипулов» и с помощью индивидуального анализа образцов, совпали в 100% случаев. Показано, что разведение при пулировании 5 образцов не оказывает влияния на эффективность выявления инфекционного агента. Анализ смеси субстратов занимал в 1,5 - 2 раза меньше времени, чем развернутый анализ отдельных субстратов на все инфекционные агенты.

С целью обоснования экономического эффекта использования метода «двойных минипулов», нами было проведено ПЦР-обследование 100 взрослых пациентов с ВП на наличие четырех инфекционных агентов: *CMV*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis* развернутым способом и методом «двойных минипулов». Сформировано 20 минипулов субстратов от 5 человек, от каждого из пациентов анализировалась смесь из двух субстратов.

Использование метода «двойных минипулов» потребовало проведения 105 ПЦР-исследований. В то же время развернутое исследование всех субстратов от каждого больного на 4 инфекционных агента потребовало бы проведения 800 ПЦР-исследований; при анализе смеси субстратов без пулирования – 400 ПЦР-исследований. Таким образом, применение метода «двойных минипулов» позволило снизить стоимость исследования в 3,8-7,6 раза.

Проведенные исследования позволили оценить частоту выявления *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis*, *CMV*, *HSV I/II* у больных воспалительными заболеваниями органов дыхания.

У детей Нижегородского региона в возрасте до года при БОД бактериальные труднокультивируемые возбудители выявлялись крайне редко. Зарегистрированы два случая обнаружения данных возбудителей: *M. pneumoniae*

у больного одиннадцатимесячного ребенка с ОБ и *C. psittaci* у двухмесячного ребенка с плевропневмонией.

У детей в возрасте от 1 года до 16 лет при патологии респираторного тракта наиболее часто обнаруживалась *M. pneumoniae*, частота выявления которой варьировала в значительных пределах (от 3,6 до 50%) в зависимости от нозологической формы и возраста обследуемых (Рисунок 2). Наиболее высокие значения этого показателя ($50,5 \pm 4,7\%$) достоверно зафиксированы у детей в возрасте от 7 до 16 лет, больных ВП ($p < 0,001$).

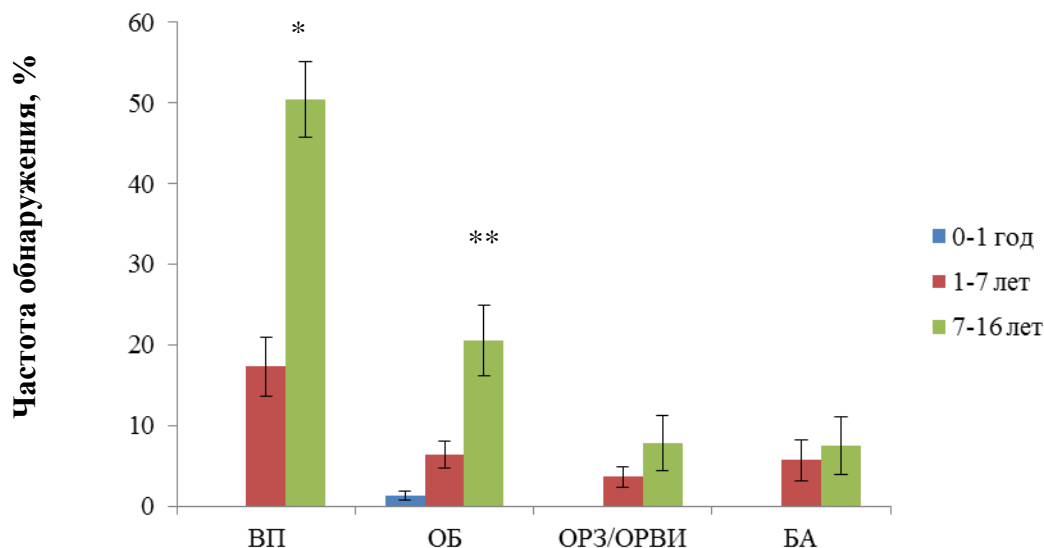


Рисунок 2. Частота обнаружения *M. pneumoniae* у детей разных возрастных групп с БОД.

Примечание: * - различия с группой детей от 1 года до 7 лет достоверны при $p < 0,001$;

** - различия с группой детей от 1 года до 7 лет достоверны при $p < 0,01$.

У детей с ОБ, ОРЗ/ОРВИ, БА в возрастных группах от 1 года до 7 лет и от 7 до 16 лет также доминировала *M. pneumoniae*: при ОБ частота ее выявления составила 6,4% и 20,5% случаев, соответственно ($p < 0,01$); при ОРЗ/ОРВИ – в 3,6% и 7,8%; при БА – 5,7% и 7,5%.

Другие бактериальные возбудители - *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *M. catarrhalis* у детей при бронхолегочной патологии встречались достаточно редко. *C. pneumoniae* выявлена при ВП в $3,6 \pm 1,8\%$ случаев у детей в возрасте от 7 до 16 лет, у детей с ОБ возбудитель обнаруживался в единичных случаях в возрастных группах от 1 года до 7 лет и от 7 до 16 лет.

Наиболее высокие показатели частоты выявления *C. psittaci* ($4,0 \pm 1,4\%$ и $3,6 \pm 2,0\%$ в возрастных группах от 1 года до 7 лет и от 7 до 16 лет) отмечены при ОБ, при других нозологических формах БОД этот микроорганизм выявлялся в единичных случаях.

Находки *M. catarrhalis* были единичными и только у детей, больных бронхитом возрастных групп от 1 года до 7 лет и от 7 до 16 лет.

L. pneumophila не удалось обнаружить ни при одной из форм патологий при обследовании детей разных возрастных групп.

В контрольной группе труднокультивируемые бактериальные микроорганизмы практически не выявлялись. Эти данные свидетельствуют о том, что широкая циркуляция «атипичных» бактериальных возбудителей не характерна для Нижегородского региона.

Результаты исследований показали высокую частоту репликации ДНК вирусов группы герпеса у детей при всех нозологических формах. Так *CMV* обнаруживался при ВП в $34,9 \pm 2,6\%$ случаев, при ОБ – в $51,9 \pm 2,6\%$ случаев, при ОРЗ/ОРВИ – в $49,0 \pm 2,5\%$ случаев и при БА – в $40,0 \pm 4,1\%$ случаев (Рисунок 3). У здоровых детей *CMV* детектировался в 2,5-3,5 раза реже ($p < 0,001$).

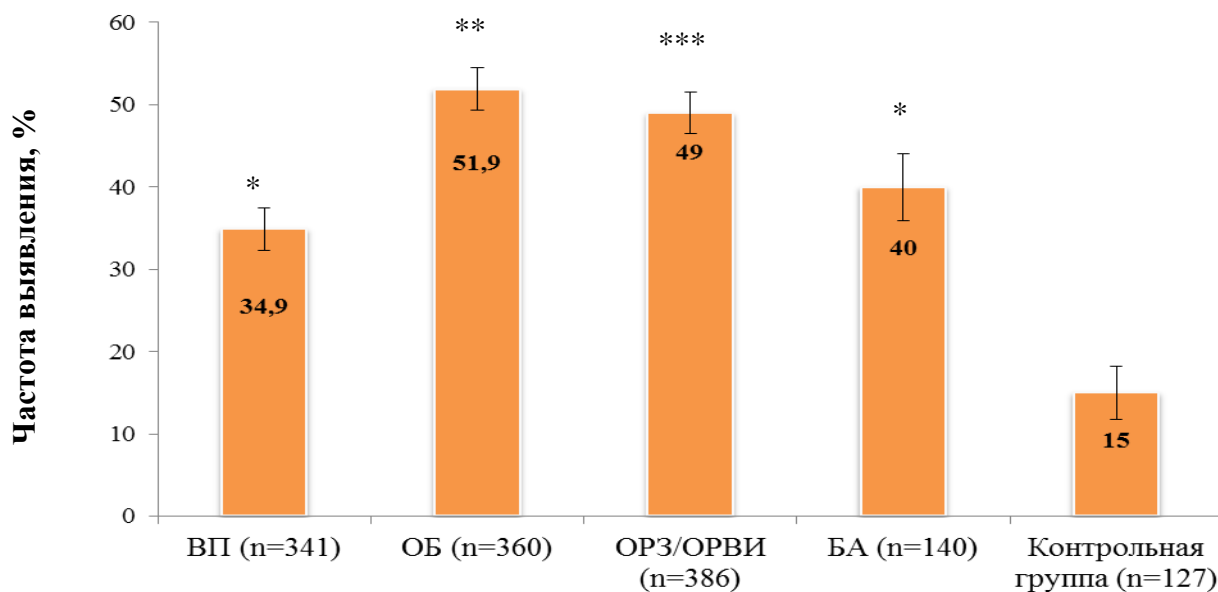


Рисунок 3. Частота выявления *CMV* у детей при различных воспалительных заболеваниях респираторного тракта.

Примечание: * - различия с контрольной группой достоверны при $p < 0,001$;

** - различия достоверны между группой детей с ОБ и группами детей с БА ($p < 0,05$), ВП, контрольной группой ($p < 0,001$);

*** - различия достоверны между группой детей с ОРЗ/ОРВИ и группами детей с ВП, контрольной группой ($p < 0,001$).

Достаточно высокие показатели частоты выявления *CMV* были продемонстрированы у детей до года и составили $26,2 \pm 3,9\%$ при ВП; $44,0 \pm 5,7\%$ при ОБ; $56,2 \pm 5,8\%$ при ОРЗ/ОРВИ (Рисунок 4).

Наиболее часто *CMV* выявлялся в группах детей от 1 года до 7 лет. При ВП вирус определялся в $56,7 \pm 4,9\%$ случаев, при ОБ – в $64,4 \pm 3,4\%$ случаев, при ОРЗ/ОРВИ – в $51,8 \pm 3,2\%$ случаев, при БА – в $50,6 \pm 5,4\%$ случаев ($p < 0,001$). Лишь у детей с ОРЗ/ОРВИ возрастных групп до года и от 1 года до 7 лет разница в частоте выявления *CMV* была недостоверной.

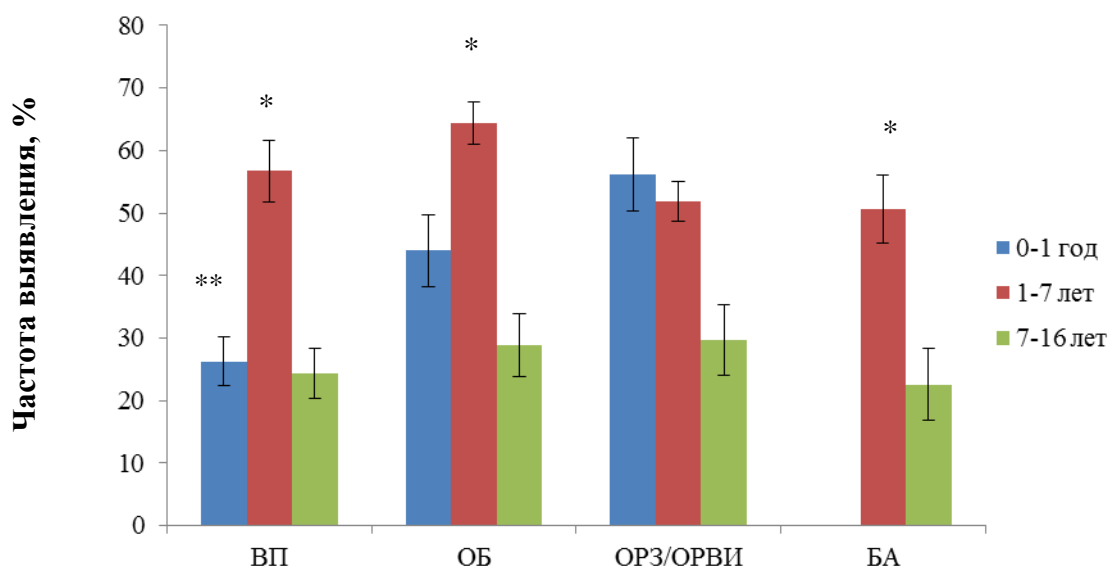


Рисунок 4. Частота выявления репликации ДНК *CMV* у детей разных возрастных групп при различных БОД.

Примечание: * - различия с группами детей до года и от 7 до 16 лет достоверны при $p < 0,001$;

** - различия достоверны между группами детей до года с ВП и группами детей до года с ОБ и ОРЗ/ОРВИ ($p < 0,01$ и $p < 0,001$, соответственно).

В группах детей от 7 до 16 лет показатели частоты выявления *CMV* были достоверно ниже и составляли $24,3 \pm 4,0\%$ при ВП; $28,9 \pm 5,0\%$ при ОБ; $29,7 \pm 5,7\%$ при ОРЗ/ОРВИ и $22,6 \pm 5,7\%$ при БА ($p < 0,001$).

Показатели частоты выявления *HSV I/II* у детей с ВП ($6,7 \pm 1,4\%$) и ОРЗ/ОРВИ ($5,2 \pm 1,1\%$) были выше, чем в контрольной группе ($p < 0,01$ и $p < 0,05$, соответственно). Достоверных отличий по частоте выявления *HSV I/II* у здоровых детей и у детей с БА и ОБ не наблюдалось.

HSV I/II выявлялся чаще у детей в возрасте от 7 до 16 лет при всех нозологических формах: при ВП - в $10,8 \pm 2,9\%$ случаев, при ОБ - в $9,6 \pm 3,2\%$, при ОРЗ/ОРВИ - в $7,8 \pm 3,6\%$, при БА - в $3,8 \pm 2,6\%$ (Рисунок 5).

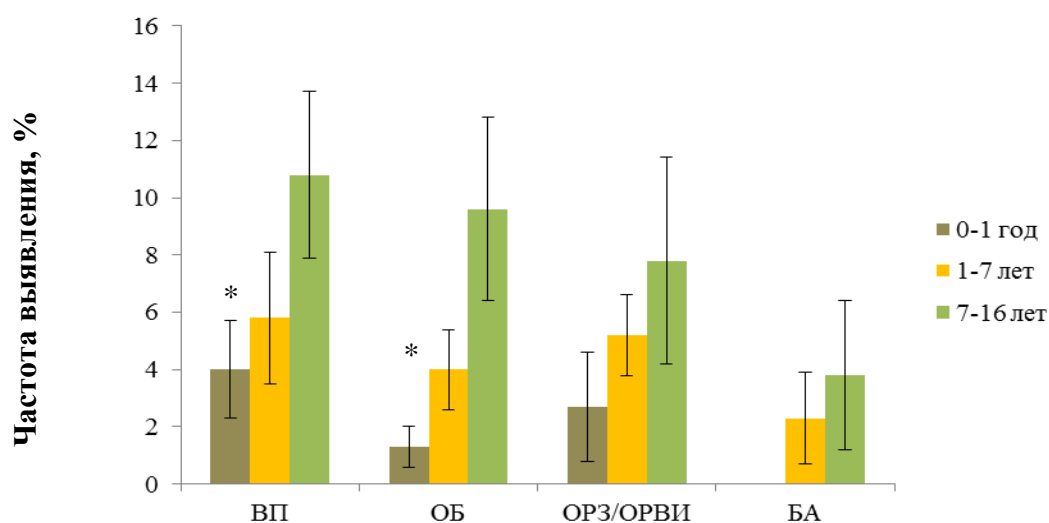


Рисунок 5. Частота выявления ДНК *HSV I/II* у детей разных возрастных групп при различных БОД.

Примечание: * - различия с группами детей от 7 до 16 лет достоверны при $p < 0,05$.

В связи с тем, что большинство обследованных взрослых, как организованных, так и неорганизованных, имели диагноз ВП, а количество больных с ОБ было незначительно, мы сочли целесообразным объединить их в одну группу, тем более что частота выявления инфекционных агентов при данных заболеваниях статистически не отличалась. В таблице 1 представлены данные о частоте выявления различных инфекционных агентов у взрослых больных воспалительными заболеваниями органов дыхания.

Таблица 1.

Частота выявления труднокультивируемых возбудителей у взрослых ($M \pm m(\%)$).

| Возбудитель | организованные | | неорганизованные | |
|-----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| | больные (n=469) | контроль (n=270) | больные (n=145) | контроль (n=52) |
| <i>M. pneumoniae</i> | 9,8±1,4 | 0 | 2,8±1,4 | 0 |
| <i>C. pneumoniae</i> | 10,4±1,4 | 0 | 1,4±1,0 | 0 |
| <i>C. psittaci</i> | 0,2±0,2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>L. pneumophila</i> | 0,6±0,4 | 0 | 0 | 0 |
| <i>M. catarrhalis</i> | 1,7±0,6 | 1,1±0,6 | 2,1±1,2 | 1,9±1,9 |
| CMV | 5,1±1,0 | 4,1±1,2 | 3,5±1,5 | 3,8±2,7 |
| HSV I/II | 15,4±1,6 | 3,3±1,0 | 10,3±2,5 | 1,9±1,9 |

Как видно из таблицы 1, *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* у организованных взрослых больных обнаруживались в 9,8% и 10,4% случаев, соответственно, тогда как в контрольной группе данные возбудители не детектировались. В группе неорганизованных взрослых больных частота выявления данных возбудителей была достоверно ниже и составляла 2,8% и 1,4%, соответственно ($p < 0,001$). В обеих группах больных наблюдалась высокая частота выявления *HSV I/II* по сравнению с группами контроля ($p < 0,01$). У военнослужащих этот показатель составил 15,4%, у неорганизованных взрослых больных - 10,3%, при этом оба показателя статистически не отличались между собой. *L. pneumophila* была обнаружена у трех военнослужащих. *C. psittaci* была обнаружена лишь у одного военнослужащего с внебольничной пневмонией. У неорганизованных взрослых больных данный возбудитель не был выявлен. Частота выявления *M. catarrhalis* у организованных и неорганизованных больных статистически не отличалась и составила 1,7% и 2,1%, соответственно.

Данные иммунологических исследований выявили наличие «иммунологической недостаточности» у военнослужащих по призыву с ВП. Так, оценка содержания цитокинов в сыворотке крови заболевших указывает на относительную слабость клеточных иммунных реакций при ВП. У больных на момент госпитализации, т.е. на пике развития воспалительного процесса, не обнаружено значительного увеличения содержания цитокинов, продуцируемых Т-хелперами первого типа — провоспалительных регуляторов интерферона- γ и фактора некроза опухолей- α (Таблица 2). Концентрация этих цитокинов

превышала их среднее содержание у здоровых лиц лишь в 1,3 и 1,6 раз, соответственно, причем максимальные значения содержания этих цитокинов у 98% обследованных не превышали 40 и 4 пг/мл, соответственно. Концентрация интерферона- α у больных ВП также несущественно превышала средние значения, свойственные здоровым людям. Средняя его концентрация составляла 7,4 пг/мл, причем у 65,5% в сыворотке крови он не был обнаружен.

Таблица 2.

Содержание цитокинов, управляющих воспалением,
в сыворотке крови больных пневмонией

| Цитокины | Концентрации цитокинов (пг/мл) в сыворотке крови | |
|--|--|-------------------------|
| | больных пневмонией (n=100) | здоровых доноров (n=50) |
| Интерферон- α | 4,41 \pm 1,03 | 4,31 \pm 1,05 |
| Интерферон - γ | 32,31 \pm 4,25 | 24,8 \pm 6,3 |
| Фактор некроза опухоли- α | 3,62 \pm 0,13 | 3,02 \pm 0,31 |
| Интерлейкин-8 | 52,14 \pm 7,83* | 25,9 \pm 4,67 |
| Рецепторный антагонист интерлейкина -1 | 1039,57 \pm 123,8* | 232,45 \pm 54,1 |

* - различия со средними значениями контрольной группы здоровых доноров достоверны при $p < 0,05$.

Среднее содержание интерлейкина-8 у больных ВП военнослужащих достоверно превышало концентрацию этого цитокина у здоровых доноров. Однако, у большинства обследованных больных пневмонией (58,9%) его содержание не превышало 30 пг/мл — верхней границы содержания интерлейкина-8 у взрослых здоровых людей.

Наиболее информативными оказались параметры, описывающие функциональное состояние клеток иммунной системы, в частности Т-лимфоцитов. В работе исследовали способность Т-лимфоцитов к продукции интерферона- γ , оценивая не количество Т-клеток, продуцирующих данный цитокин в ходе заболевания, а потенциальную способность иммунной системы к выполнению этой функции. Показано, что количество Т-лимфоцитов, способных продуцировать интерферон- γ среди военнослужащих, поступивших в госпиталь с диагнозом ВП, существенно ниже, чем в контрольной группе практически здоровых доноров.

Средние значения количества Т-клеток, отвечающих продукцией интерферона на активацию, в группе больных пневмонией в момент начала заболевания составили 16,24 \pm 2,15%, тогда как в группе здоровых доноров соответствующий показатель составлял 29,25 \pm 3,5% ($p < 0,001$). Выявление данного функционального дефекта ставит вопрос о целесообразности проведения иммунокорректирующих мероприятий, направленных на компенсацию дефицита продукции интерферонов при пневмонии. В связи с этим, использование

индукторов продукции интерферона в терапии ВП представляется нецелесообразным и предпочтение следует отдать заместительной иммунокоррекции с использованием препаратов интерферона. Показано важное прогностическое значение исследования уровней циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) у пациентов с ВП. Так, у больных уровень высокомолекулярных ЦИК в среднем составил $68 \pm 13,5$ у.е., низкомолекулярных ЦИК 149 ± 13 у.е. Соотношение низкомолекулярных ЦИК к высокомолекулярным ЦИК (ЦИКок/относительный коэффициент/) колеблется в диапазоне 0,3-23,4; что может свидетельствовать о диагностической значимости данного показателя при воспалительно-деструктивных процессах в легких. Наблюдалась тенденция к уменьшению количества ЦИК и увеличению ЦИКок с нарастанием тяжести заболевания. Так, в группах с легким течением пневмонии уровень высокомолекулярных ЦИК достигал 360 у.е., наименьшее значение ЦИКок в этой группе составляло 0,34. В группе со средней степенью тяжести данный показатель составил 120 у.е., наименьший ЦИКок был равен 1,1. Тяжелое течение ВП сопровождалось парадоксальным снижением уровня ЦИК, что свидетельствует о снижении иммунокомпетентности гуморального звена иммунитета. В этой группе наблюдался самый низкий уровень ЦИК - 74 у.е., наименьшее значение ЦИКок составило 2,03.

Анализ частоты обнаружения *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis*, CMV, HSV I/II позволил разработать алгоритм ПЦР-детекции данных возбудителей, предназначенный для их первичного скрининга у детей и взрослых с БОД. При проведении обследования используют мокроту, БАЛ, мазки из ротоглотки, у детей первого года жизни возможно использование слюны. На первом этапе выделяют ДНК из смеси биологических субстратов, собранных от одного пациента. Субстраты смешивают в равных количествах таким образом, чтобы объем смеси составил 100 мкл, что является рекомендуемым объемом материала при выделении ДНК с использованием набора реагентов «ДНК-Сорб В» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Далее проводят ПЦР исследование на наличие возбудителей, частота выявления которых превышает 5%: у детей до года – CMV; у детей от 1 года до 7 лет - *M. pneumoniae*, CMV, HSV I/II; у детей от 7 до 16 лет - *M. pneumoniae*, CMV, HSV I/II (рис.4); у взрослых (неорганизованных) - HSV I/II. Для ПЦР-детекции CMV, HSV I/II, *M. pneumoniae* используют тест-системы серии «АмплиСенс» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) согласно инструкциям по их применению. ПЦР детекцию *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis* осуществляют с помощью наборов реагентов GenPak DNA PCR test производства ООО «Изоген» (г. Москва). Амплификацию проводят на приборах «Терцик МС-2» (ДНК-технология, г. Москва) или «My Cycler» (Bio-Rad, США).

Для ПЦР-детекции редких видов возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания формируется минипул из препаратов ДНК, выделенных из смесей субстратов от пяти (четырех, трех) человек. Препараты ДНК смешивают в равных объемах таким образом, чтобы объем смеси для постановки одного ПЦР анализа составил 10 мкл (от 5 человек – по 2 мкл; от 4 –

по 2,5 мкл; от 3 – по 3,3 мкл). Детекцию продуктов амплификации проводят методом горизонтального электрофореза в 1,8% агарозном геле. При выявлении в минипуле одного или нескольких возбудителей исследованию подвергаются каждый из компонентов пула. Используют те же тест-системы и электрофоретический способ детекции продуктов ПЦР. Пример разработанного алгоритма представлен на рисунке 6.

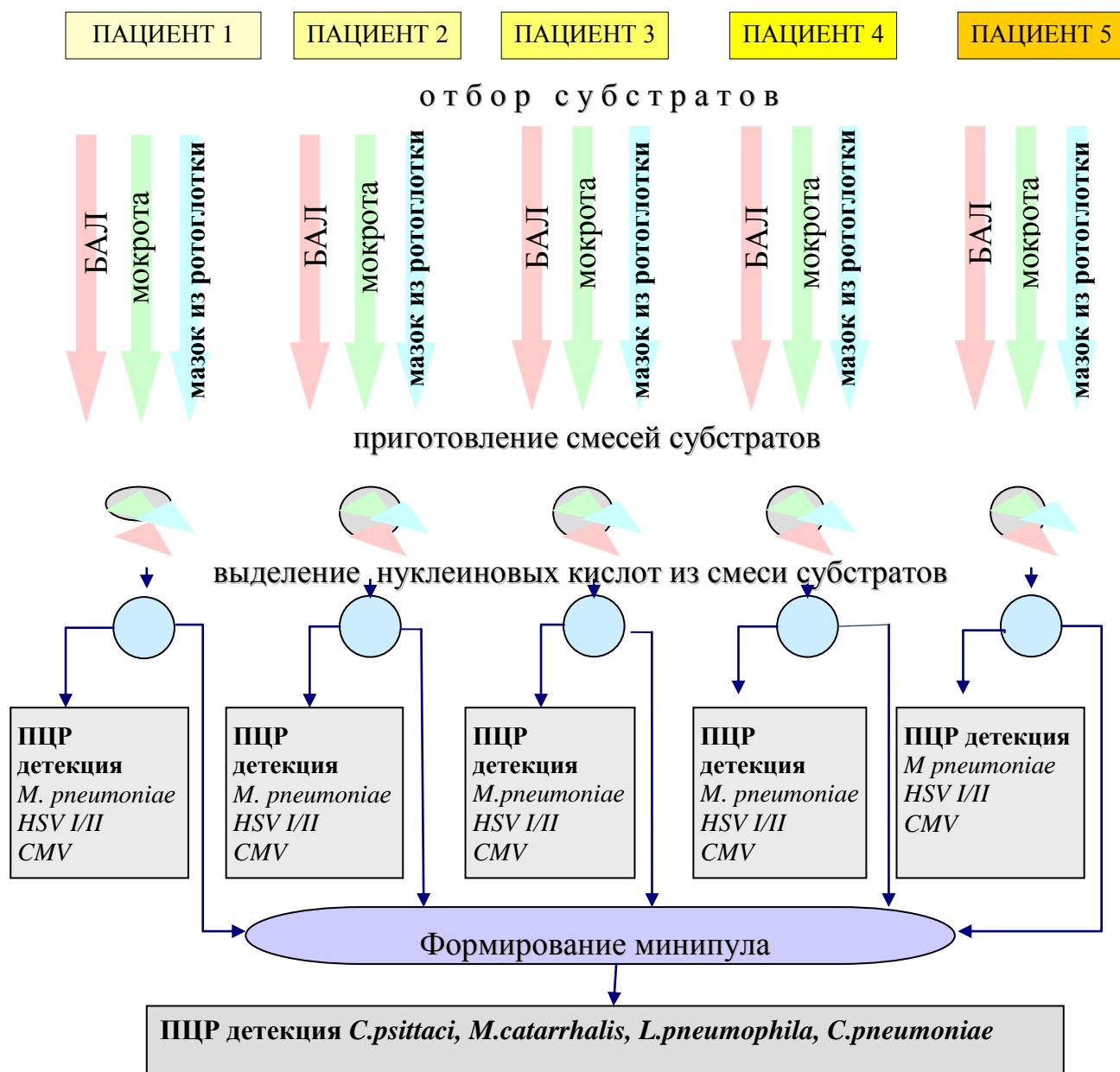


Рисунок 6. Алгоритм ПЦР-детекции труднокультивируемых возбудителей заболеваний органов дыхания у детей от 1 года до 16 лет.

Разработанный метод внедрен в работу лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов и Волго-Вятского регионального научно-практического центра индикации, идентификации и таксономии микроорганизмов и организации противоэпидемической работы в экстремальных условиях ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной.

Методом «двойных минипулов» целесообразно выявлять следующие инфекционные агенты: у детей в возрасте до года – *M.pneumoniae*, *HSV I/II* типов, *C.psittaci*, *C.pneumoniae*, *L.pneumophila*, *M.catarrhalis*; у детей в возрасте от 1 года до 7 лет – *C.pneumoniae*, *C.psittaci*, *L.pneumophila*, *M.catarrhalis*; у детей в возрасте от 7 до 16 лет – *C.pneumoniae*, *C.psittaci*, *L.pneumophila*, *M.catarrhalis*; у взрослых (неорганизованных) – *M.pneumoniae*, *C.pneumoniae*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis*, *CMV*; у взрослых (организованных) – *C.psittaci*, *L.pneumophila*, *M.catarrhalis*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная экспериментальная работа позволила сделать следующие основные заключения:

1. Оптимизирован способ выявления труднокультивируемых микроорганизмов – возбудителей заболеваний органов дыхания методом ПЦР, основанный на пулировании смесей субстратов от 3-5 пациентов («двойные минипулы»), позволяющий осуществлять экономически оправданный скрининг больных с разными типами патологии респираторного тракта и уменьшить продолжительность диагностических исследований в 1,5-2 раза.
2. Установлено, что при инфекциях респираторного тракта наиболее информативными субстратами для детекции труднокультивируемых микроорганизмов методом ПЦР являются мокрота (инфекционный агент выявляется в 52,8% образцах) и мазки с задней стенки глотки (41,9% положительных находок). Исследование смеси этих субстратов позволяет увеличить частоту выявления возбудителей на 18-35%.
3. Обнаружена высокая частота выявления *M. pneumoniae* у детей в возрасте от 7 до 16 лет с внебольничными пневмониями и острыми бронхитами – в 50,5% и 20,5 % случаев соответственно. Установлен низкий уровень частоты обнаружения *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis* в Нижегородском регионе среди детей и взрослых (организованных и неорганизованных) с бронхолегочной патологией.
4. Выявлена активная репликация вирусов группы герпеса у детей разных возрастных групп. Наиболее высокие показатели частоты выявления *CMV* (50,6% – 64,4%) зарегистрированы у детей в возрасте от 1 месяца до 7 лет, а *HSV I/II* (7,8% – 10,8%) – у детей от 7 до 16 лет независимо от нозологической формы основного заболевания.
5. Показано, что у взрослых в организованных коллективах доминирующими видами труднокультивируемых возбудителей, выявляемых при инфекциях респираторного тракта, являются *M. pneumoniae* (9,8%) и *C. pneumoniae* (10,4%). Отмечена более низкая частота выявления данных патогенов в группе неорганизованных взрослых больных: *M. pneumoniae* – 2,8%, *C. pneumoniae* – 1,4%. Частота выявления *HSV I/II* была высокой как в группе организованных, так и неорганизованных лиц и составила 15,4% и 10,3%, соответственно, достоверно превышая аналогичный показатель в группе практически здоровых лиц (контроль).

Практические рекомендации.

1. При осуществлении эпидемиологического надзора за внебольничными пневмониями и при планировании комплекса лечебно-профилактических мероприятий рекомендуется учитывать региональные особенности распространения труднокультивируемых инфекционных агентов.
2. Широкое распространение отдельных видов труднокультивируемых микроорганизмов, ассоциированных с заболеваниями органов респираторного тракта, свидетельствует о необходимости комплексного ПЦР-обследования больных на спектр данных возбудителей.
3. Разработанный алгоритм выявления труднокультивируемых возбудителей заболеваний органов дыхания, основанный на ПЦР-анализе, рекомендуется для проведения экономически оправданного скрининга больных с разными типами патологии респираторного тракта, поскольку уменьшает продолжительность и стоимость диагностических исследований.
4. Наличие функциональных дефектов иммунной системы, выявленное у военнослужащих, больных ВП, свидетельствует о необходимости иммунологического обследования пациентов и целесообразности проведения иммунокорректирующей терапии, направленной на компенсацию дефицита продукции интерферонов.

Перспективные направления дальнейшей разработки темы

Существует несколько актуальных направлений дальнейшей разработки темы. Во-первых, важной задачей является мониторинг распространенности труднокультивируемых возбудителей заболеваний органов дыхания с использованием разработанного алгоритма их ПЦР-детекции. Во-вторых, экономически оправданным является применение метода «двойных минипулов» в молекулярной диагностике БОД с целью расширения спектра инфекционных агентов. Третье перспективное направление связано с исследованием генетической вариабельности и антибиотикорезистентности труднокультивируемых инфекционных патогенов с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования, позволяющей более детально изучать циркулирующие популяции возбудителей заболеваний органов дыхания.

Публикации по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК.

1. Бруснигина, Н.Ф. Этиологическая структура внебольничной пневмонии / Н.Ф. Бруснигина, В.Н. Мазепа, Л.П. Самохина, О.М. Черневская, К.А. Орлова, **Е.В. Сперанская**, Л.Е. Скобло, Н.Н. Кленина, Н.Н. Барышева // Медицинский альманах. - 2009.- №2(7).- С.118-120.
2. Махова, М.А. Результаты многолетних исследований распространенности вирусов группы герпеса среди детского населения Нижнего Новгорода / М.А. Махова, В.Н. Мазепа, Н.Ф. Бруснигина, О.М. Черневская, К.А. Орлова, **Е.В. Сперанская**, Н.Н. Барышева, Л.Е. Скобло, Н.Н. Кленина // Медицинский альманах.- 2011.-№4(17).-С.48-49.

3. **Сперанская, Е.В.** Роль бактерий родов *Mycoplasma* и *Ureaplasma* в развитии воспалительных заболеваний органов дыхания у детей / Е.В. Сперанская, В.Н. Мазепа, Н.Ф. Бруснигина и др. // Медицинский альманах.- 2011.-№4(17).-С.49-50.
4. **Сперанская, Е.В.** Мониторинг циркуляции редких и труднокультивируемых возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания среди детей и взрослых Нижнего Новгорода/ Е.В. Сперанская, В.Н. Мазепа, Н.Ф. Бруснигина и др.//Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского.-2012.-выпуск 2 (3).- С.107-113.
5. **Сперанская, Е.В.** Изучение распространенности редких и труднокультивируемых возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания/ Е.В. Сперанская, В.Н. Мазепа, Е.И. Ефимов, Н.Ф. Бруснигина//Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.- 2012.-№5.-с.3-8.

Патент на изобретение:

6. Патент РФ №2406088 от 10.12.2010 Способ выявления редких и труднокультивируемых форм возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания (*Cytomegalovirus*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*) с использованием метода ПЦР/Мазепа В.Н., Бруснигина Н.Ф., Черневская О.М., Орлова К.А., Скобло Л.Е., **Сперанская Е.В.**, Кленина Н.Н., Ефимов Е.И.; заявитель и патентообладатель: ФБУН ННИИЭМ имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора – заявка № 2009125502 от 03.07.2009, опубликовано 10.12.2010г., бюл. №34.

Медицинская технология:

7. Ефимов, Е.И. Комплексное ПЦР-обследование пациентов с инфекционно-аллергическими заболеваниями органов дыхания: новая медицинская технология / Е.И. Ефимов, В.Н. Мазепа, Н.Ф. Бруснигина, О.М. Черневская, К.А. Орлова, М.А. Махова, Е.В. Сперанская, Л.Е. Скобло//разрешение № 209/084 от 21.04.09 Минсоцздрава РФ, Н. Новгород.-2009.-11 с.

Методические рекомендации:

8. Ефимов, Е.И. Выявление редких труднокультивируемых форм возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания с использованием метода ПЦР: методические рекомендации (МР 4.2.0060-12) /Е.И. Ефимов, В.Н. Мазепа, Н.Ф. Бруснигина, О.М. Черневская, К.А. Орлова, М.А. Махова, **Е.В. Сперанская**, Н.Н. Кленина, Л.Е. Скобло // Бюллетень нормативных и методических документов госсанэпиднадзора. – Москва.- 2012 .- выпуск 4. – декабрь (50) .- С.136-143.

Тезисы в сборниках материалов конференций:

9. Ефимов, Е.И. ПЦР в диагностике внебольничной пневмонии у военнослужащих / Е.И. Ефимов, В.Н. Мазепа, Н.Ф. Бруснигина, О.М. Черневская, К.А. Орлова, **Е.В. Сперанская**, М.А. Махова, С.Д. Жоголев, П.И. Огарков, С.Б. Яцышина // Материалы Второго Всероссийского форума «Здоровье нации – основа процветания России» (г. Москва). - 2006. - ч. 2. -

С.126-127.

- 10.Мазепа, В.Н. Выявление вирусов *Epstein-Barr* и *Cytomegalovirus* у детей различных возрастов с разными формами патологии /В.Н. Мазепа, Н.Ф. Бруснигина, К.А. Орлова, О.М. Черневская, **Е.В. Сперанская**, Л.Е. Скобло, М.А. Махова // Тезисы VII Российского съезда инфекционистов «Новые технологии в диагностике и лечении инфекционных болезней» (г. Н.Новгород).- 2006. - С.162-163.
- 11.Мазепа, В.Н. Генодиагностика атипичных возбудителей органов дыхания / В.Н. Мазепа, Н.Ф. Бруснигина, О.М. Черневская, **Е.В. Сперанская**, М.А. Махова, Н.Н. Барышева, К.А. Орлова, Л.Е. Скобло // Материалы научной конференции, посвященной 85-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной. «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний» (г.Н. Новгород).-2006. - С.133-134.
- 12.Ефимов, Е.И. Опыт использования ПЦР при этиологической диагностике внебольничных пневмоний у военнослужащих/ Е.И. Ефимов, В.Н. Мазепа, Н.Ф. Бруснигина, О.М. Черневская, К.А. Орлова, **Е.В. Сперанская**, Г.А. Шипулин, С.Д. Жоголев // Труды всерос. науч. конф., посвящ. 210-й годовщине основания ВМА «Теоретические основы эпидемиологии. Современные эпидемиологические и профилактические аспекты инфекционных и массовых неинфекционных заболеваний», 17-18 апреля 2008 г. (г. С.-Петербург).-2008.– т.1.- С.185-186.
- 13.Мазепа, В.Н. Распространенность вирусов *Epstein-Barr* и *Cytomegalovirus* у часто болеющих детей промышленного мегаполиса / В.Н.Мазепа, К.А. Орлова, Н.Ф. Бруснигина, О.М. Черневская, **Е.В. Сперанская**, Л.Е. Скобло, М.А. Махова, Н.Н. Кленина // Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения. Материалы юбилейной Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 90-летию ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (г. Нижний Новгород). - 2009. - С.86-87.
- 14.Бруснигина, Н.Ф. Этиологическая структура внебольничной пневмонии / Н.Ф. Бруснигина, В.Н. Мазепа, Л.П.Самохина, О.М. Черневская, К.А. Орлова, **Е.В. Сперанская**, Л.Е. Скобло, Н.Н. Кленина, Н.Н. Барышева // Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения. Материалы юбилейной Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 90-летию ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (г. Н.Новгород). - 2009.- С.125-127.
- 15.Бруснигина, Н.Ф. Изучение распространения атипичных труднокультивируемых возбудителей воспалительных бронхолегочных заболеваний / Н.Ф. Бруснигина, В.Н. Мазепа, О.М. Черневская, К.А. Орлова, **Е.В. Сперанская**, Л.Е. Скобло, М.А. Махова, Н.Н. Кленина, Н.Н. Барышева // Молекулярная диагностика-2010. Сб. трудов VII Всеросс. научн-практ.конф. (г. Москва). - 2010. - т.4. - С.155-157.
- 16.**Сперанская, Е.В.** Распространенность *Mycoplasma pneumoniae* при

инфекционной патологии респираторного тракта у детей и взрослых Нижнего Новгорода/Е.В. Сперанская, Н.Ф. Бруснигина, О.М. Черневская и др.//Материалы V Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням – Инфекционные болезни. – М. - 2013 г. – с. 378.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БОД – болезни органов дыхания

ВП – внебольничная пневмония

CMV – цитомегаловирус

HSV I/II - герпес простой I/II типа

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ОБ – острый бронхит

БА – бронхиальная астма

ОРЗ – острое респираторное заболевание

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж

ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы

ЦИКок – относительный коэффициент (соотношение низкомолекулярных ЦИК к высокомолекулярным ЦИК)

E-mail автора: speranskaya.elena@bk.ru

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843)238-76-01, e-mail: ziabramova@mail.ru